電泳技術在柑橘育種上之應用[1)]

Application of Electrophoresis in Citrus Breeding[1)]

吳明哲[2)] 陳福旗[3)] 劉邦基[3)]

Wu Min-tze, Chen Fure-chyi and Liou Pan-chi

摘　要：本研究以本省栽培最重要的柑橘——椪柑、桶柑、柳橙、檸檬、葡萄柚和柚子等的幼嫩葉片或成熟葉片爲材料，利用電泳分離技術，探討 peroxidase (PRX) 、esterase (EST) 、superoxide dismutase (SOD)、glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) 、shikimic dehydrogenase(ShDH)、malate dehydrogenase(MDH)、及 phosphoglucose isomerase (PGI) 等七種酵素之同功異構酶基因型之差異，做爲將來育種上珠心胚苗與有性胚苗鑑定之依據，以提高育種效率。

試驗結果顯示，GOT、PRX及PGI 三種酵素的同功異構酶在不同柑橘之間具有差異性，即這些酵素均爲多型性，其餘酵素在不同柑橘之間則差異不大或沒有差異。再以柳橙和柚子雜交後代來進行試驗，顯示GOT及PRX 可做爲分辨珠心胚或有性胚苗的依據。珠心胚苗的GOT及PRX同功異構酶和母本柳橙的一樣，而有性胚苗的PRX 很明顯的表示出兩親本的混合型。

控制同功異構酶表現的基因型及其在育種上的應用，將在本文加以討論。

關鍵字：柑橘、電泳、同功異構酶、育種

Key words: Citrus, electrophoresis, isozymes, breeding

前　言

植物酵素可以用多種生化方法加以分離，例如色析法、膠質過濾法、沉降離心法、血清法及電泳法 (Shannon, 1968) ，其中電泳法係利用蛋白質帶電荷的特性，在不同

---

1)本研究承農委會經費補助：75農建—7.1—糧—118(3)、76農建—8.1—糧—10(2)，謹此致謝。
本試驗進行期間，承卓俊銘、李弘文協助操作，郭美蕙協助電腦資料編排，葉節耀及黃阿賢提供材料，謹此誌謝。

2)行政院農業委員會技正。Horticultural Expert, Council of Agriculture, ROC.

3)臺灣省農業試驗所園藝系助理研究員。Assistant Horticulturist TARI

pH值之下，可在電場中分開，而加以染色（Peirce & Brewbaker, 1973）。

常用於同功異構酶分析的電泳膠體有聚丙烯醯胺膠體（polyacrylamide gel, PAG）和澱粉膠體（starch gel）。同功異構酶（isozymes）爲具有相同的催化活性，但可能由不同基因所控制，在不同組織表現（Peirce & Brewbaker, 1973），利用電泳技術將其分離染色之後，呈現不同條帶類型（以下簡稱條型，banding pattern）。

由先前的試驗分析已知Peroxidase(PRX)及 glutamate oxaloacetate transaminase（GOT）的同功異構酶在不同的柑橘種類間具有差異性（吳、卓，1986），可以做爲鑑定種間差異的參考，但PRX的解析力在使用 PAG 膠體電泳分析時，仍然偏低，不易判斷。Iglesias等人（1974）曾利用PAG法分析PRX，認爲此酵素的同功異構酶可用以區別雜交有性胚及珠心胚苗。以往的數篇報告亦指出其他酵素如 GOT、phosphogluc-oisomerase（PGI）、及phosphoglucomutase（PGM）等，可做爲柑橘類的遺傳標誌（Soost & Torres, 1981; Soost et al., 1980；Torres et al., 1978），陳及李（1988）也報告柑橘類的 PGI 具有多型性（polymorphism），可做爲種間的一個遺傳標誌；其他經分析且有變異性的酵素還有 malatedehydrogenase (MDH)、hexokinase (HK)、socitrate dehydrogenase (IDH) 及6-P-gluconate dehydrogenase (6-PGDH) (Soost) & Torres, 1981; Hirai & Kozaki, 1981）。

本試驗報告GOT, shikimic dehydrogenase (ShDH), MDH, esterase (EST) 及PRX的同功異構酶的分析結果，及其在區分珠心胚及有性胚上的應用。

材料與方法

利用椪柑、桶柑、柳橙、檸檬、葡萄柚及柚子爲材料的分析結果，已經發表報告（吳、卓，1986）。本文將以柳橙及柚子雜交之後代進行分析葉片同功異構酶。

本試驗所用之柑橘父母本及雜交後代之葉片均取自農試所嘉義分所，母本爲柳橙結果株，父本爲柚子結果株，雜交後代小苗爲一年生，有些已可從外觀辨認爲有性胚苗，供試材料爲剛展開之綠色葉片或成熟之葉片，萃取方法有二，一種用緩衝液（陳、李，1988），將含有此液體之葉片在稱藥盤上，以壓克力棒磨碎後，萃取液經高速離心（Hitach SCR20BA, 15000rpm, 4°C, 10分鐘）後，上澄液供直立式電泳分析ShDH；其他酵素分析用之萃取液則直接將葉片冷凍後，以平口鉗擠出汁液，供水平式澱粉膠（陳、李，1988）或直立式聚丙烯醯胺膠體電泳（吳、卓，1986）。

所分析的酵素有：EST, GOT, MDH, PRX 及 ShDH，其染色方法參照吳、卓（1986），陳、李（1988）及 Vallejos（1983），染色後聚丙烯醯胺膠體用玻璃紙包住，直接乾燥後保存，澱粉膠體則用50%甘油固定一天，用保潔膜包好，放進冰箱，並且均用黑白軟片或彩色幻燈片拍照供分析記錄。

結　果

以直立式聚丙烯醯胺膠體電泳分析之同功異構酶有EST, GOT及ShDH，其中 EST 表現之條帶不甚清楚不予討論，而 GOT 之染色條帶較淡，但仍可看出在柳橙及柚子之間具有差異性(圖 1)，柳橙及柚子均有三個條帶，但位置不同，珠心胚均與母本相同，有性胚則屬於混合型，但染色極弱，因此不易判斷。ShDH 在電泳圖上可見到 7 條清

楚的條帶（圖2），但在父母本之間及雜交後代無法加以區別。

經澱粉膠體電泳分析的同功異構酶有MDH及PRX，前者在膠體上的解析力不佳，大部份條帶的分佈都呈模糊，因此必須以其他緩衝液系統進行解析。柳橙及柚子之PRX間有兩個位置具有明顯差異（圖3），其中正極的PRX—1在柳橙係FF型，其移動性較快，柚子則為PRX-1^{ss}型，移動性較慢，珠心胚苗呈現與母本柳橙相似的條帶分佈，而有性胚苗的PRX—1均為FS型，係父母本提供各半基因所得之產物。在負極另有一條PRX—3，柳橙為SS型，而柚子為FF型，其有性胚苗則有FS或SS型。綜合起來，有性胚苗的性狀為：（1）PRX—1^{FS} PRX—3^{FS}，或（2）PRX—1^{FS}PRX—3^{SS}。

討　　論

由前次發表之結果（吳、卓，1986；陳、李，1988）及本文試驗結果顯示，柑橘類多型酵素系統包括：PRX、PGI、GOT，其中GOT及PRX可較明確地用於鑑定有性胚苗。其餘如EST雖也具有多型性，但在有些植株之表現不甚清楚（吳、卓，1986），需於雜交之前先確定父母本的EST同功異構酶類型，才能做為鑑定之參考。

MDH在本報告雖然解析力很低，在木瓜則用另一個緩衝液系統，已可清楚分辨種間雜交苗（陳、郭，1988），應可再以此酵素分析柑橘種間或品種間的差異性。此外ShDH在木瓜屬只有1至2條同功異構酶條帶（陳，1987），而在柑橘類則多至7條（圖2），其原因可能係酵素本身被修飾，也可能是由一群基因族（gene family）所控制合成，此點值得繼續研究。

綜合前人發表的酵素種類及本文所提出之結果，建議在進行柑橘育種計畫時，以同功異構酶的差異性做為分子標誌，配合型態上的判斷，進行雜交育種，其步驟如下：（1）選定父母本各若干株，分別編號，（2）篩檢父母本單株葉片之同功異構酶型，（3）雜交授粉，（4）播種，（5）幼苗子葉或葉片同功異構酶檢定，（6）將有性胚苗與珠心胚苗根據電泳的結果分開，（7）最後為繼續培育所需要的有性胚苗材料。

參考文獻

1. 陳福旗・1987・利用同功異構酶作爲番木瓜屬的遺傳標誌，農委會計畫報告，76農建—8.1—糧—13(9)。
2. 陳福旗・郭美蕙・1988・木瓜的胚珠及子房培養和體胚發生。刊於：園藝作物組織培養應用研討會，臺大園藝系，臺北。
3. 陳福旗・李弘文・1988・簡易澱粉膠體電泳裝置及其在同功異構酶上的應用。中華農業研究37(1)：24—31。
4. 吳明哲・卓俊銘・1986・柑橘葉片同功異構酶之研究。I、本省重要柑橘葉片之電泳分析與葉齡對分析結果之影響。中華農業研究35(4)：484—494。
5. Hirai, M. & I. Kozaki. 1981. Isozymes of citrus leaves. Proc. Int. Soc. Citriculture 1：10—13.
6. Iglesias, L., H. Lima & J. P. Simon. 1974. Isoenzyme identification of zygotic and nucellar seedlings in Citrus. J. Hered. 65：81—84.
7. Peirce, L. C. & J. L. Brewbaker. 1973. Application of isozyme analysis in horticultural science. Hort Science 8(1)：17—22.
8. Shannon, L. M. 1968. Plant isozymes. Ann. Rev. Plant Physiol. 19：187—210.
9. Soost. R. K. & A. M. Torres. 1981. Leaf isozymes as genetic markers in citrus. Proc. Int. Soc. Citriculture 1：7—10.
10. Soost, R. K., T. E. Williams & A. M. Torres. 1980. Identification of nucellar and zygotic seedlings of citrus with leaf isozymes. HortScience 15：728—729.
11. Torres, A. M., R. K. Soost & U. Diedenhofen. 1978. Leaf isozymes as genetic markers in citrus. Amer. J. Bot. 65：869—881.
12. Vallejos, C. E. 1983. Enzyme activity staining, In: Tanksley, S. D. & T. J. Orton (eds), Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A, pp. 469—516, Elsevier, Amsterdam.

Summary

Young leaves from plants of six important citrus species in Taiwan Ponkan (Citrus reticulata), Tankan (C. tankan), Liucheng (C. sinensis), Lemon (C. limon, Hort. var. Eureka), grapefruit (C. paradisi, Hort. var. Ruby) and Pummelo (C. grandis, Hotr. var. Wentan) were used for analyzing isozyme variation by electrophoresis.

Seven enzymes were studied in the experiment, including peroxidase (PRX), esterase (EST), superoxide dismutase (SOD), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), shikimic dehydrogenase (ShDH), malate dehydrogenase (MDH) and phosphoglucose isomerase (PGI).

The purpose of this study was to see if any isoenzyme marker can be used to distinguish zygotic from nucellar seedlings in order to increase breeding efficiency.

The results showed that GOT, PRX and PGI are polymorphic among different citrus species. All other four enzymes were monomorphic.

GOT and PRX had been adopted to distinguish zygotic seedlings in a cross between Liucheng and Wentan pummelo.

Isozyme banding of nucellar seedlings had the same patterns with pistil parent (Liucheng).

Hybrid band of PRX isozymes confirmed a true hybrid in certain tested plantlets.

Genetics of isozymes and their application for citrus breeding program was discussed briefly in the report.

問 題 討 論

黃阿賢：

據我所看到的報告，絕大部份利用電泳可以區別雜交苗和珠心胚苗的是在不同 Species 之間；不同的 Species 很多可以用肉眼大致上都可以區分到相當高的比率，在不同品種間、種間、種內雜交的話，目前是不是可以用電泳方法來區別？

陳福旗：

柑橘本身是非常具有異質性的，不同品種之間差異相當大，雖然形態上看不出來，但是利用生化上我想是可行的，但是必須父母本先作一番篩選。

黃阿賢：

不同 Species 之間很多用肉眼就可區別，在同一品種間雜交的話，是不是用電泳的方法就可以區別出來雜交苗？

陳福旗：

我想可以試試看。

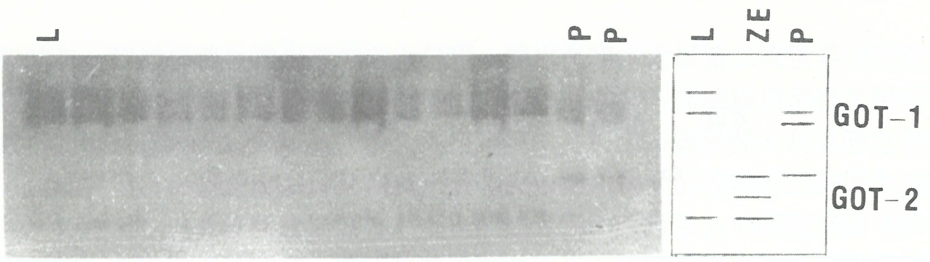

圖1. 柳橙×柚子之葉片中的GOT同功異構酶，GOT-2可用以鑑定有性胚（ZE），推測有性胚在GOT-2應呈三個條帶，珠心胚則與母本柳橙（L）相同。

Fig. 1. Banding pattern of GOT isozymes from the leaves of Liu-Cheng×Pummelo. GOT—2 can be used to identify zygotic embryo (ZE). A putative ZE will show three bands in GOT—2. Nucellar embryo has the same banding pattern as female parent (L).

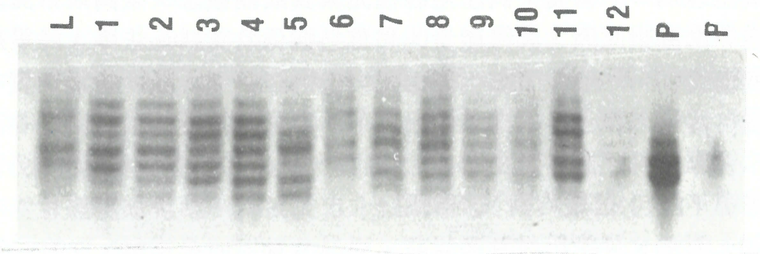

圖2. 柳橙×柚子之葉片中的ShDH同功異構酶，從父本（P. Pummelo）或母本（L. Liu-Cheng）無法判斷雜交後代（1—12）是否爲有性胚。

Fig. 2. Banding pattern of ShDH isozymes from the leaves of Liu-Cheng×Pummelo. Zygotic embryo can't be identified by this enzyme.

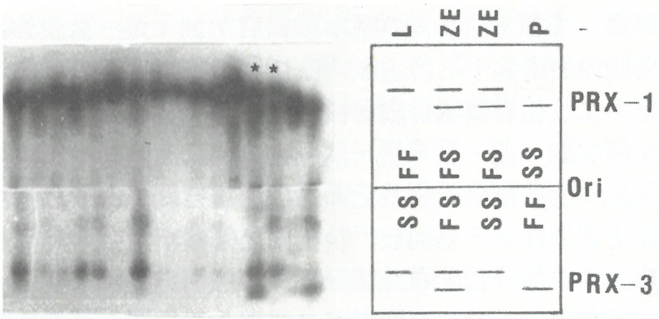

圖3. 柳橙×柚子之葉片中的 PRX 同功異構酶，圖中最左邊一個是柳橙，其次11個爲珠心胚苗，星號爲有性胚苗，最後兩個是柚子，右邊分解圖中， 柳橙的 PRX-1 爲 FF. PRX-3爲SS；柚子的PRX-1爲SS. PRX-3 爲 FF. 。因此有性胚苗一株爲 PRX-1, PRX-3；另一株爲PRX-1, PRX-3。

Fig. 3. Banding pattern of PRX isozymes from the leaves of Liu-Cheng×Pummelo. The most left one in the picture is Liu-Cheng, followed by eleven nucellar seedlings. The two stars are zygotic seedlings which are ended by two Pummelos. PRX—1 in Liu-Cheng is FF type, PRX—3 is SS. PRX—1 in Pummelo is SS type, PRX—3 is FF. Therefore zygotic seedlings have the phenotype of either PRX—1^{FS}, PRX—3^{FS} or PRX—1^{FS}, PRX—3^{SS} respectively.